

PATENT APPLICATION
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Docket No: Q86049

Nicoletta BIANCHI, et al.

Application No.: 10/522,737

Group Art Unit: 1614

Confirmation No.: 8521

Examiner: Brian Yong S KWON

Filed: October 12, 2005

For: USE OF ANGELICIN AND ITS STRUCTURAL ANALOGUES FOR THE
TREATMENT OF THALASSEMIA

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

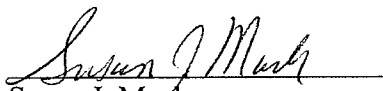
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to
priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to
acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860


Susan J. Mack
Registration No. 30,951

WASHINGTON OFFICE

23373

CUSTOMER NUMBER

Enclosures: TO2002A000684
Date: February 27, 2009



28.08.03

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 08 SEP 2003

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

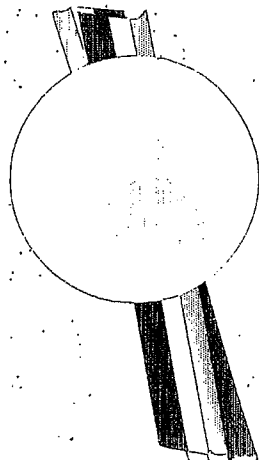
N. TO2002 A 000684



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li **12 AGO. 2003**



IL DIRIGENTE

Elena Marinelli

Sig.ra E. MARINELLI

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA
Residenza FERRARA FE codice 00484690884
2) Denominazione ASSOCIAZIONE VENETA PER LA LOTTA ALLA TALASSEMIA
Residenza ROVIGO RO codice 80009850250

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome EDGARDO DEAMBROGI ed altri
(Isr. No. 931B) cod. fiscale
denominazione studio di appartenenza Jacobacci & Partners S.p.A.
via CORSO REGIO PARCO n. 27 città TORINO cap 10152 (prov) TO

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via n. città cap (prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) gruppo/sottogruppo

NUOVO USO DELL'ANGELICINA E DI SUOI ANALOGHI STRUTTURALIANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) BIANCHI NICOLETTA 3) GAMBARI ROBERTO
2) BORGATTI MONICA 4) LAMPRONTI ILARIA

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10) 11) 12)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

I TITOLARI PARTECIPANO AI DIRITTI SUL BREVETTO NEI SEGUENTI MISURE:
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA 90% ASSOCIAZIONE VENETA PER LA
LOTTA ALLA TALASSEMIA 10%, AI SENSI DELL'ART. 1127/39.

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA CARICO SEGUONO.

N. es.

| Doc. | PROV | n. pag. | riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) | SCIoglimento RISERVE |
|---------|------|---------|--|----------------------|
| | | | | Data N° Protocollo |
| Doc. 1) | PROV | 16 | riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) | |
| Doc. 2) | PROV | 10 | disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) | |
| Doc. 3) | RIS | | dichiarazione sostitutiva di certificazione | |
| Doc. 4) | RIS | | designazione inventore | |
| Doc. 5) | RIS | | documenti di priorità con traduzione in italiano | |
| Doc. 6) | RIS | | autorizzazione o atto di cessione | |
| Doc. 7) | | | nominativo completo del richiedente | |

8) attestati di versamento, totale lire

CENTOTTANTOTTO/51

obbligatorio

COMPILATO IL 13/07/2002

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

EDGARDO DEAMBROGI
(Isr. No. 931B)

CONTINUA SINO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO

Jacobacci & Partners S.p.A.

C. C. I. A. A. DI TORINO

codice

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

2002 A000684

L'anno millenovecento

duemiladue

il giorno

trentuno

del mese di

luglioIl (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE
DUINO CHIALE

del rogante

L'UFFICIALE ROGANTE
Mirella CAVALLARI
CATEGORIA C

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

2002 A000684

DATA DI DEPOSITO

DATA DI RILASCIO

31/07/2002

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA

FERRARA

FE

D. TITOLO

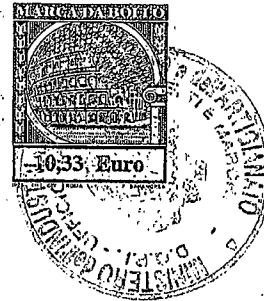
NUOVO USO DELL'ANGELICINA E DI SUOI ANALOGHI STRUTTURALI

Classe proposta (sez./cl./scl/)

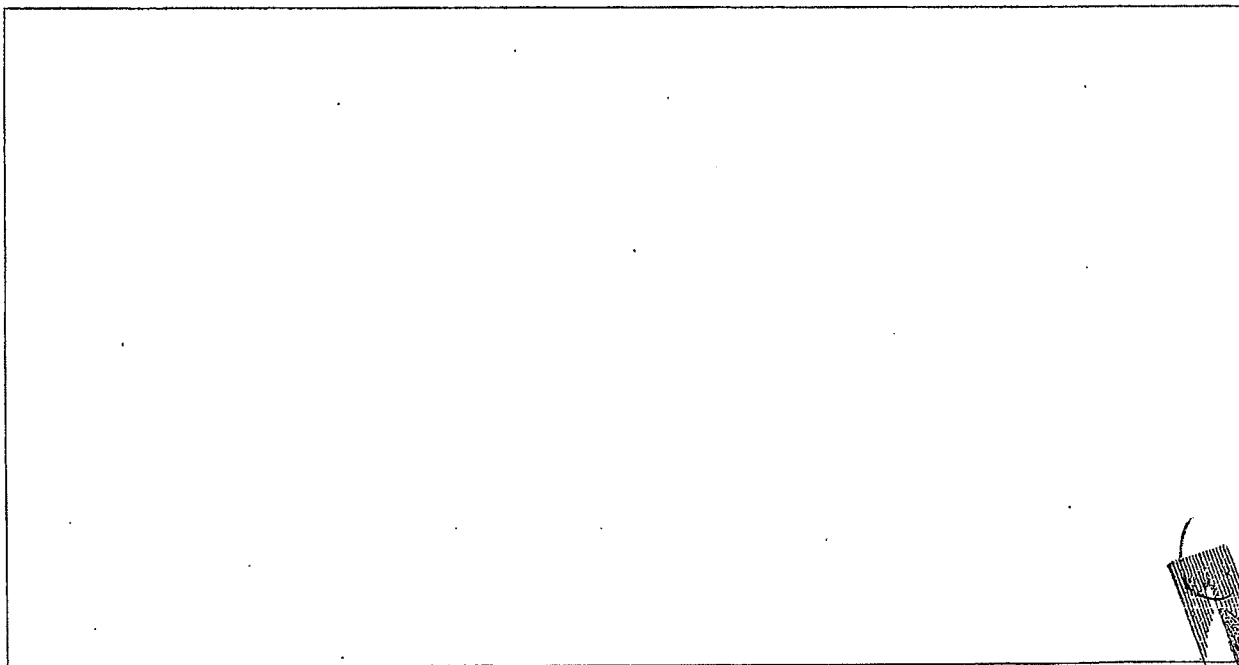
(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

E' descritto l'uso dell'angelicina e di suoi analoghi strutturali per la preparazione di un medicamento per il trattamento della beta-talassemia. Un analogo strutturale particolarmente preferito a tale scopo è il bergaptene.



M. DISEGNO



CC. 14 A.
TOM. 17

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
"Nuovo uso dell'angelicina e di suoi analoghi
strutturali".

Di: Università degli Studi di Ferrara, nazionalità
italiana, Via Savonarola 9, Ferrara (IT); Associazione
Veneta per la lotta alla Talassemia, nazionalità
italiana, c/o Centro di Microcitemia dell'Azienda ULSS
18, Rovigo, (IT).

Inventori designati: BIANCHI, Nicoletta; BORGATTI
Monica; GAMBARI, Roberto; LAMPRONTI Ilaria.

Depositata il: 31 luglio 2002

2002 A000684

* * * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un nuovo uso
terapeutico dell'angelicina e di suoi analoghi
strutturali, come molecole in grado di indurre il
differenziamento cellulare eritroide e di incrementare
la produzione di RNA messaggero per la gamma-globina.

L'esistenza di sostanze in grado di indurre
l'espressione del gene per la gamma-globina e la
biosintesi di emoglobina fetale (HbF) in soggetti
adulti è nota da tempo (1). Nella maggior parte dei
casi, tali sostanze sono anche in grado di attivare o
potenziare la trascrizione dei geni per le globine
embrionali e fetali in sistemi sperimentali modello.

JACOBACCI & PARTNERS SpA

Recentemente, ad esempio, sono state descritte numerose molecole leganti il DNA aventi la capacità di indurre un aumento dell'espressione dei geni per le gamma-globine (2). Tra queste citiamo il cisplatino e analoghi del cisplatino, la mitramicina, la cromomicina e la tallimustina (3). Queste molecole sono efficaci modificatori dell'espressione dei geni per la globina gamma.

Nell'essere umano, l'attivazione della trascrizione dei geni per le globine gamma in soggetti adulti conduce alla produzione di emoglobina fetale mimando il fenotipo HPFH (High Persistence of Fetal Hemoglobin) che conferisce un quadro clinico favorevole a pazienti affetti da beta-talassemia, anche in forma omozigote (4). Una terapia che preveda l'impiego di molecole aventi tale attività per il trattamento di pazienti affetti da beta-talassemia potrebbe pertanto rendere tali soggetti maggiormente indipendenti dalla terapia trasfusionale (5).

Alla base della presente invenzione vi è la necessità di nuovi modificatori del processo di trascrizione utilizzabili nel trattamento della beta-talassemia che presentino un elevato livello di induzione dell'espressione dei geni gamma-globinici e contemporaneamente un effetto citotossico ridotto

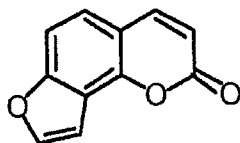
rispetto a quello di farmaci di riferimento.

E' stato da noi sorprendentemente trovato che l'angelicina - un derivato iso-psoralenico che possiede attività fotochemioterapica - così come i suoi analoghi strutturali, possiedono tale attività. In particolare, è stato trovato che l'angelicina ed i suoi analoghi strutturali sono in grado di potenziare l'espressione del gene per la globina gamma umana.

Tale attività è inaspettata alla luce degli utilizzi terapeutici noti dell'angelicina e dei suoi analoghi strutturali (6-18).

L'angelicina è infatti stata proposta in letteratura per il trattamento della psoriasi (12,13), come agente antiproliferativo (14,15,16) e antifungino (8) e come agente antiinfiammatorio (17).

La formula di struttura dell'angelicina è la seguente:

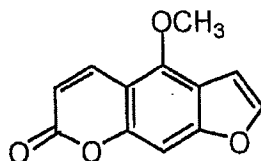


Angelicina (2-oxo-(2H)-furo(2,3-h)-1-benzopirano)

La sintesi chimica dell'angelicina e dei suoi analoghi strutturali è stata descritta in letteratura (si vedano ad esempio i riferimenti 6-11).

Analoghi strutturali dell'angelicina sono ad esempio le cumarine lineari ed angolari eventualmente sostituite, gli eteroanaloghi dell'angelicina, i tiopirano-benzofurani, le acilangelicine, le alchilangelicine, le alcossicarbamoilangelicine, gli psoraleni e gli isopsoraleni eventualmente sostituiti. Un esempio specifico è l'analogo furanocumarinico lineare bergaptene (5-metossipsoralene), che viene attualmente utilizzato nella terapia PUVA (Psoraleni più radiazioni UVA) per la cura della psoriasi.

La formula di struttura del bergaptene è la seguente:



Bergaptene (5-metossipsoralene)

Grazie alla loro capacità di potenziare l'espressione del gene per la globina gamma umana, l'angelicina e i suoi analoghi strutturali possono essere vantaggiosamente utilizzati per il trattamento terapeutico di pazienti affetti da beta-talassemia.

Un primo oggetto della presente invenzione è quindi l'uso dell'angelicina o di un suo analogo strutturale per la preparazione di un medicamento per il



JACOBACCI & PARTNERS SpA

trattamento terapeutico della beta-talassemia.

Preferibilmente, detto analogo strutturale è scelto dal gruppo che consiste di cumarine lineari ed angolari eventualmente sostituite, eteroanaloghi dell'angelicina, tiopirano-benzofurani, acilangelicine, alchilangelicine, alcossicarbamoilangelicine, psoraleni e isopsoraleni eventualmente sostituiti.

Un analogo strutturale particolarmente preferito è il bergaptene.

Inoltre, come è stato recentemente descritto (18, 19), un trattamento combinato con diversi modificatori del processo di trascrizione permette di incrementare ulteriormente l'espressione dei geni per la globina gamma.

Conseguentemente, un secondo oggetto della presente invenzione è l'uso dell'angelicina o di un suo analogo strutturale in combinazione con almeno un ulteriore modificatore del processo di trascrizione per la preparazione di un medicamento per il trattamento della beta-talassemia.

Secondo una forma di attuazione preferita, detto ulteriore modificatore del processo di trascrizione è scelto nel gruppo che consiste di citosina arabinoside, acido retinoico, plicamicina,

JACOBACCI & PARTNERS SpA

idrossiurea, guanina, guanosina trifosfato (GTP), guanosina difosfato (GDP) e guanosina monofosfato (GMP). Tra questi sono maggiormente preferiti citosina arabinoside ed acido retinoico.

L'attività dell'angelicina come induttore del differenziamento cellulare eritroide e della produzione di mRNA per la gamma-globina è stata valutata in colture di cellule umane.

I risultati di tale studio sono illustrati negli esempi che seguono. I dati riportati negli esempi indicano che l'attività dell'angelicina è superiore rispetto a quella dell'idrossiurea, un farmaco di riferimento per l'induzione di emoglobina fetale (HbF). Inoltre è stato verificato che l'effetto citotossico riscontrabile è molto inferiore a quello dell'idrossiurea.

Gli esempi che seguono vengono forniti a scopo di illustrazione e non sono intesi a limitare in alcun modo la portata dell'invenzione.

Esempio 1

La valutazione dell'attività biologica dell'angelicina è stata condotta esaminando la capacità di tale composto di modulare l'espressione dei geni per la globina gamma nella linea cellulare umana K562, che è in grado di differenziare in senso

eritroide esprimendo i geni per la globina gamma se sottoposta a trattamento con modificatori della risposta biologica adatti a tale scopo (3,18,19).

Il livello di differenziamento è stato valutato analizzando la positività delle cellule alla benzidina (3). La produzione di emoglobina è stata valutata mediante elettroforesi su acetato di cellulosa e colorazione del gel con una soluzione a base di benzidina/H₂O₂ (3). L'espressione dei geni codificanti per le globine gamma è stata valutata mediante RT-PCR (reverse transcriptase PCR) quantitativa (3).

Alcuni tra i dati ottenuti sono riportati in tabella 1. Come si può facilmente notare, l'angelicina (400 µM) è in grado di indurre un incremento della percentuale di cellule K562 positive alla benzidina (55-60% delle cellule trattate, paragonato al 3-4% delle cellule K562 di controllo). L'emoglobina prodotta in modo preponderante dalle cellule K562 trattate con l'angelicina è l'Hb Portland (alfa2gamma2). I dati ottenuti con la RT-PCR quantitativa dimostrano che tale effetto sul differenziamento è associato ad un aumento dell'accumulo intracitoplasmatico di mRNA per la globina gamma. Tali valutazioni sono state eseguite dopo 6 giorni di induzione con angelicina 400 µM.

Anche il bergaptene mostra la capacità di indurre il differenziamento (misurato come incremento di cellule positive alla benzidina), anche se questa capacità è associata ad un incremento inferiore dell'accumulo di mRNA per la globina.

L'induzione del differenziamento eritroide in cellule trattate con angelicina è molto simile a quello ottenuto con citosina arabinoside, uno degli induttori noti più efficaci (18, 19). Tuttavia, l'attività dell'angelicina sull'incremento di produzione dell'mRNA per la globina gamma è significativamente superiore a quella della citosina arabinoside.

Tabella 1

| Composto | Concentrazione
(μ M) | ^(a) Differenziamento
eritroide (%) | ^(b) mRNA per la
globina gamma |
|-------------------------|------------------------------|--|---|
| - | - | 3-4 | 1 |
| citosina
arabinoside | 1 | 75-80 | 3,24 |
| bergaptene | 200 | 50-60 | 3,48 |
| angelicina | 400 | 55-60 | 44,94 |

(a) Differenziamento eritroide = percentuale di cellule K562 positive alla benzidina (media \pm SD di sei esperimenti). Le concentrazioni indicate sono



JACOBACCI & PARTNERS SpA.

quelle ottimali per ogni molecola al fine di ottenere l'attivazione del differenziamento eritroide. Incrementando tali concentrazioni si ottiene una diminuzione dell'effetto sui parametri differenziativi, in associazione ad un'attività citotossica delle molecole stesse.

(b) L'accumulo di RNA per la globina gamma è riportato in tabella come incremento rispetto a quello di cellule K562 di controllo non trattate. La tecnica utilizzata è quella della RT-PCR quantitativa (22,23) utilizzando i seguenti oligonucleotidi-primer e sonda: gamma-globin forward primer, 5'-TGG CAA GAA GGT GCT GAC TTC-3'; gamma-globin reverse primer, 5'-TCA CTC AGC TGG GCA AAG G-3'; sonda gamma-globin, 5'-FAM-TGG GAG ATG CCA TAA AGC ACC TGG-TAMRA-3' (FAM = 6-carbossi fluoresceina, TAMRA = 6-carbossi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina). Le analisi sono state eseguite su materiale estratto da cellule trattate per 6 giorni alle condizioni indicate.

Esempio 2

Per verificare se l'angelicina sia anche in grado di stimolare la produzione di mRNA per la gamma-globina in precursori eritroidi umani isolati da sangue periferico, è stata impiegata la tecnica pubblicata da Fibach et al. (20,21). Questa tecnica

prevede due fasi: nella prima fase le cellule isolate da sangue periferico di un soggetto sano o affetto da una patologia emopoietica, come l'anemia falciforme o la β -talassemia, vengono seminate in terreno di coltura addizionato del 10% di medium condizionato derivante dalla linea cellulare di carcinoma di vescica 5637. La seconda fase consiste nel coltivare le cellule isolate in un terreno di coltura adatto, addizionato dell'ormone eritropoietina, 30% di siero fetale bovino, 2-mercaptoetanololo, albumina, glutamina e desametasone per permettere la proliferazione e la maturazione delle cellule staminali di tipo eritroide. In questa fase le cellule possono essere trattate con potenziali induttori di HbF. Ad esempio, con questo sistema era stato dimostrato che l'idrossiurea, un inibitore della sintesi del DNA utilizzato attualmente nella terapia sperimentale della β -talassemia, è in grado di indurre la produzione di HbF.

I risultati ottenuti utilizzando questa tecnica hanno dimostrato un incremento nella produzione di mRNA per la gamma-globina in cellule trattate con angelicina rispetto alle stesse non trattate (20,53 volte). Tale incremento è superiore a quello riscontrabile utilizzando idrossiurea (tabella 2).

Tabella 2

| Composto | Concentrazione
(μ M) | ^(a) mRNA per la
globina gamma |
|-------------|------------------------------|---|
| - | - | 1 |
| angelicina | 500 | 20,53 |
| idrossiurea | 120 | 6,96 |

(a) L'accumulo di RNA per la globina gamma è riportato in tabella come incremento rispetto a quello di precursori eritroidi di controllo non trattati. La tecnica utilizzata è quella della RT-PCR quantitativa (22,23) utilizzando gli oligonucleotidi primer e sonda descritti nella tabella 1. L'idrossiurea è stata utilizzata alla concentrazione di 120 μ M poiché questa molecola a concentrazioni confrontabili con quelle utilizzate per l'angelicina presenta un'elevata attività citotossica. Tale attività altamente citotossica comincia a riscontrarsi a concentrazioni superiori a 250-300 μ M.

Bibliografia

1. Rodgers GP, Rachmilewitz EA, British J. Haematology, 91:263-268, 1995.
2. Rochette J, Craig JE e Thein SL, Blood Reviews, 8: 213-224, 1994.
3. Bianchi N, Chiarabelli C, Borgatti M, Mischiati C, Fibach E, Gambari R. Br J Haematol, 113(4):951-61, 2001.
4. Dover GJ, Brusilow S, Samid D, New England Journal of Medicine, 327: 569-570, 1992.
5. Ikuta T, Atweh G, Boosalis V, White GL, De Fonseca S, Boosalis M, Faller DV, Perrine SP, Annals of New York Academy of Sciences, 850:87-99, 1998.
6. Kong LD, Tan RX, Woo AY, Cheng CH. Pharmacol Toxicol, 88(2):75-80, 2001.
7. Mosti L, Lo Presti E, Menozzi G, Marzano C, Baccichetti F, Falcone G, Filippelli W, Piucci B. Il Farmaco, 53(8-9):602-10, 1998.
8. Sardari S, Mori Y, Horita K, Micetich RG, Nishibe S, Daneshtalab M. Bioorg Med Chem, 7(9):1933-40, 1999.
9. Jakobs AE, Christiaens L. J Org Chem, 61(14):4842-4844, 1996.
10. Iester M, Fossa P, Menozzi G, Mosti L, Braccichetti F, Marzano C, Simonato M. Il Farmaco, 50 (10): 669-678, 1995.



JACOBACCI & PARTNERS spa

11. Bisagni E. Photochem Photobiol, Review, 14(1-2):23-46, 1992.
12. Dall'Acqua F, Vedaldi D, Bordin F, Baccichetti F, Carlassare F, Tamaro M, Rodighiero P, Pastorini G, Guiotto A, Recchia G, Cristofolini. J Med Chem, 26(6):870-6, 1983.
13. Dall'Acqua F, Vedaldi D, Guiotto A, Rodighiero P, Carlassare F, Baccichetti F, Bordin F. J Med Chem, 24(7):806-11, 1981.
14. Conconi MT, Montesi F, Parnigotto PP. Pharmacol Toxicol, 82(4):193-8, 1998.
15. Marzano C, Severin E, Pani B, Guiotto A, Bordin F. Environ Mol Mutagen, 29(3):256-64, 1997.
16. Bordin F, Dall'Acqua F, Guiotto A. Pharmacol Ther, Review, 52(3):331-63, 1991.
17. Backhouse CN, Delporte CL, Negrete RE, Erazo S, Zuniga A, Pinto A, Cassels BK. J. Ethnopharmacol, 78(1): 27-31, 2001.
18. Bianchi N, Ongaro F, Chiarabelli C, Gualandi L, Mischiati C, Bergamini P, Gambari R. Biochem Pharmacol, 60:31-40, 2000.
19. Bianchi N, Osti F, Rutigliano C, Ginanni Corradini F, Borsetti E, Tomassetti M, Mischiati C, Feriotto G e Gambari R, British Journal of Haematology, 104:258-263, 1999.

20. Fibach E. Hemoglobin, 22: 445-458, 1998.
21. Fibach E, Burke KP, Schechter AN, Noguchi CT & Rodgers GP. Blood, 81: 1630-1635, 1993.
22. Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM. Genome Research, 6: 986-994, 1996.
23. Gibson UE, Heid CA & Williams PM. Genome Research, 6: 995-1001, 1996.

JACOBACCI & PARTNERS SpA

RIVENDICAZIONI

1. Uso dell'angelicina o di un suo analogo strutturale per la preparazione di un medicamento per il trattamento terapeutico della beta-talassemia.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto analogo strutturale è scelto dal gruppo che consiste di cumarine lineari ed angolari eventualmente sostituite, eteroanaloghi dell'angelicina, tiopirano-benzofurani, acilangelicine, alchilangelicine, alcossicarbamoilangelicine, psoraleni e isopsoraleni eventualmente sostituiti.
3. Uso secondo la rivendicazione 2, in cui detto analogo strutturale è il bergaptene.
4. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta angelicina o analogo strutturale è in combinazione con almeno un ulteriore modificatore del processo di trascrizione.
5. Uso secondo la rivendicazione 4, in cui detto ulteriore modificatore del processo di trascrizione è scelto nel gruppo che consiste di citosina arabinoside, acido retinoico, plicamicina, mitramicina, idrossiurea, guanina, guanosina trifosfato (GTP), guanosina difosfato (GDP) e guanosina monofosfato (GMP).



JACOBACCI & PARTNERS SpA.

PER INCARICO
Edg. De Ambrogio
EDGARDO DEAMBROGI
(Iscri. No. 9312)